

# OBTENCION DE PLANTAS NUCELARES LIBRES DE VIRUS DE DIVERSAS VARIEDADES DE AGRIOS DEL GRUPO NAVEL (*C. SINENSIS* (L.) OSBECK) POR CULTIVO DE OVULOS "IN VITRO"

L. NAVARRO

J. JUAREZ

J. F. BALLESTER

J. A. PINA (\*)

Carmen ORTEGA

Departamento de Citricultura. C. R. I. D. A. 07 (Levante). I. N. I. A. (\*\*)

## SÍNTESIS.

En este trabajo se han estudiado distintas etapas de la técnica de cultivo de óvulos de agrios *in vitro* y se han establecido las condiciones óptimas para la obtención de plantas nucelares de variedades del grupo Navel. Mediante esta técnica se han obtenido plantas libres de «virus» de *Navelina*, *Washington Navel*, *Washington Navel Precoz* y *Navelate*.

## INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades de los agrios causadas por virus, viroides y micoplasmas («virus») ocasionan una disminución en el vigor, productividad y longevidad de la planta y afectan a la calidad del fruto. Estas enfermedades son uno de los principales problemas que afectan a la citricultura española, produciendo graves pérdidas económicas (NAVARRO, 1977). Por ello es necesaria la utilización de material de propagación libre de «virus» para obtener la productividad máxima de las plantaciones.

En España, prácticamente el 100 % de las variedades autóctonas están

---

(\*) I. N. S. P. V.

(\*\*) Apartado Oficial. Moncada (Valencia).

afectadas por una o varias «virosis», por lo que hay que recurrir a métodos que permitan la obtención de plantas libres de «virus» a partir de plantas enfermas. Actualmente se lleva a cabo en el Departamento de Citricultura del C. R. I. D. A. 07 un programa de obtención de plantas libres de «virus» de las variedades de agrios cultivadas en España (NAVARRO, 1976). El programa se basa fundamentalmente en la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (NAVARRO, ROISTACHER y MURASHIGE, 1975, 1976; ROISTACHER, NAVARRO y MURASHIGE, 1976), debido a las ventajas de esta técnica sobre otros métodos existentes para obtener plantas de agrios libres de «virus» (NAVARRO y JUÁREZ, 1978; ROISTACHER, 1978). No obstante, en el programa también se aborda la obtención de plantas nucelares libres de «virus» (NAVARRO, 1977). Hasta el momento se han obtenido plantas nucelares de algunas variedades poliembriónicas por siembra directa de semillas (GONZÁLEZ-SICILIA *et al.*, 1977) y de clementinas monoembriónicas por cultivo de nucelas *in vitro* (JUÁREZ, NAVARRO y GUARDIOLA, 1976).

La obtención de plantas nucelares de variedades poliembriónicas sin semillas presenta importantes problemas. En algunas variedades puede inducirse la formación de semillas por polinización manual, pero en otras, como las del grupo Navel, la degeneración del megasporocito hace muy difícil la obtención de semillas. Este problema puede solucionarse mediante la técnica de cultivo de óvulos *in vitro* (BITTERS *et al.*, 1970; BUTTON y BORNMAN, 1971a, 1971b; KOCHBA, SPIEGEL-ROY y SAFRAN, 1972). La técnica consiste en cultivar *in vitro* óvulos sin abortar extraídos de frutos jóvenes, con el fin de inducir la formación de embriones nucelares.

En la presente publicación se estudian distintos parámetros de la técnica de cultivo de óvulos *in vitro* y se describe la obtención de plantas nucelares libres de «virus» de variedades del grupo Navel mediante la aplicación de esta técnica.

Las variedades del grupo Navel son las más importantes en España, representando el 40 % de la producción total de cítricos. La sanidad de los clones autóctonos es deficiente y todo ello justifica el interés de la puesta a punto de técnicas y obtención de plantas libres de «virus» de estas variedades.

## MÉTODOS EXPERIMENTALES Y MATERIAL UTILIZADO.

### a) *Material vegetal.*

Como fuente de óvulos se utilizaron frutos de árboles de las variedades *Navelina*, *Washington Navel*, *Navelate* y *Washington Navel Precoz*. Las tres primeras son cultivadas extensamente en España, mientras que la última es una nueva mutación que está actualmente en estudio (R. BONO, datos no publicados). De cada una de las variedades se seleccionó un árbol que se ajusta estrictamente a las características varietales y presenta caracteres agro-

CUADRO 1

*Variedades utilizadas como fuente de óvulos  
y estado sanitario de las mismas*

Variedad	«Virosis» presentes (*)
Navelina	EX, VE
Washington Navel	VE
Washington Navel Precoz	EX, PS, VE, XY
Navelate CN-1	CG, EX
Navelate CN-2	CG, EX, VE, XY
Navelate P-1	CG, EX, VE
Navelate P-2	CG, EX

(\*) CG, Concave gum; EX, Exocortis; PS, Psoriasis;  
VE, Vein enation; XY, Xyloporosis.

nómicos deseables. En el cuadro 1 se muestra el estado sanitario de los árboles seleccionados de cada variedad.

Para estudiar la influencia de la edad del fruto en la evolución de los óvulos cultivados *in vitro*, éstos se aislaron de ovarios procedentes de flores antes de la antesis (fig. 1) y de frutos en desarrollo de 2, 4, 6, 8 y 10 semanas de edad.

#### b) *Aislamiento de los óvulos.*

Los ovarios procedentes de flores antes de la antesis se esterilizaron en superficie por inmersión durante 10 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 0,5 %, a la que se añadió 0,1 % del mojante Tween 20. Los frutos se lavaron con agua corriente y se esterilizaron por inmersión durante 20 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 1 % con 0,1 % del mojante Tween 20.

Los ovarios y los frutos se abrieron con un bisturí en condiciones estériles; los óvulos se extrajeron con ayuda de un stereomicroscopio y se cultivaron individualmente en tubos de ensayo. Para la realización de las experiencias de comparación del potencial de embriogénesis de óvulos enteros y de nucelas se utilizaron frutos de *Washington Navel* de 8 semanas de edad; las nucelas se extrajeron a través de un orificio practicado en los tegumentos del óvulo en la zona de la chalaza.

Para estudiar la influencia del almacenamiento de los frutos en la capacidad de embriogénesis de los óvulos, se realizaron cultivos de óvulos procedentes de frutos de *Washington Navel* de 8 semanas de edad almacenados en nevera a 4°C durante 1, 2, 3 y 4 semanas.

c) *Método de cultivo.*

El medio base (MB) de cultivo estaba constituido por las sales minerales de MURASHIGE y SKOOG (1962), suplementadas con 100 mg/l de *i*-inositol, 1 mg/l de clorhidrato de piridoxina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 0,2 mg/l de clorhidrato de tiamina, 500 mg/l de extracto de malta, 50 g/l de sacarosa y 10 g/l de Bacto agar. El pH del medio se ajustó a  $5,7 \pm 0,1$  mediante la adición de hidróxido sódico 1N. El medio se distribuyó en partes alícuotas de 25 ml en tubos de ensayo de  $25 \times 150$  mm y éstos se taparon con tapones de polipropileno. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Se cultivó un óvulo en cada tubo de ensayo, colocándolos en la superficie del medio de cultivo. En las experiencias realizadas se han utilizado 40 réplicas en cada una de las condiciones ensayadas.

Los tubos de cultivo se mantuvieron en una cámara a 27°C, con una intensidad luminosa de 1.000 luxes durante 16 horas al día.

d) *Obtención de plantas.*

Las plantas se obtuvieron por germinación de los embriones producidos por los óvulos. Para ello se utilizaron embriones con los cotiledones y la radícula bien formados, con un tamaño comprendido entre 4 y 10 mm (figura 7). Los embriones se recultivaron individualmente en el MB recién preparado. Se realizaron ensayos de germinación en el MB suplementado con ácido giberélico (1 mg/l) y/o sulfato de adenina (27 mg/l).

Las plantas se transplantaron al alcanzar un tamaño de unos 3 cm. El método de transplante fue similar al descrito por NAVARRO, ROISTACHER y MURASHIGE (1975). Consistió en colocar las plantas en macetas de 13 cm de diámetro con un suelo artificial compuesto por turba (60 %) y arena (40 %), al que se añadió una fertilización de fondo consistente en fósforo, magnesio y microelementos (NAUER, ROISTACHER y LABANAUSKAS, 1968); el pH del suelo se ajustó a 6 con carbonato cálcico y el suelo se esterilizó con vapor a 100°C durante una hora. Las macetas se regaron después del transplante con la solución de sales minerales de MURASHIGE y SKOOG (1962), se introdujeron en bolsas de plástico, que se cerraron para evitar la desecación de las plantas, y se colocaron en una zona sombreada del invernadero (18-25°C). Las bolsas se abrieron al cabo de unos diez días y, después de otros diez días, las macetas se sacaron de las bolsas y se cultivaron en condiciones «standard» de invernadero.





Fig. 1. Fuente de óvulos, Flor de *W. Navel* antes de la antesis.

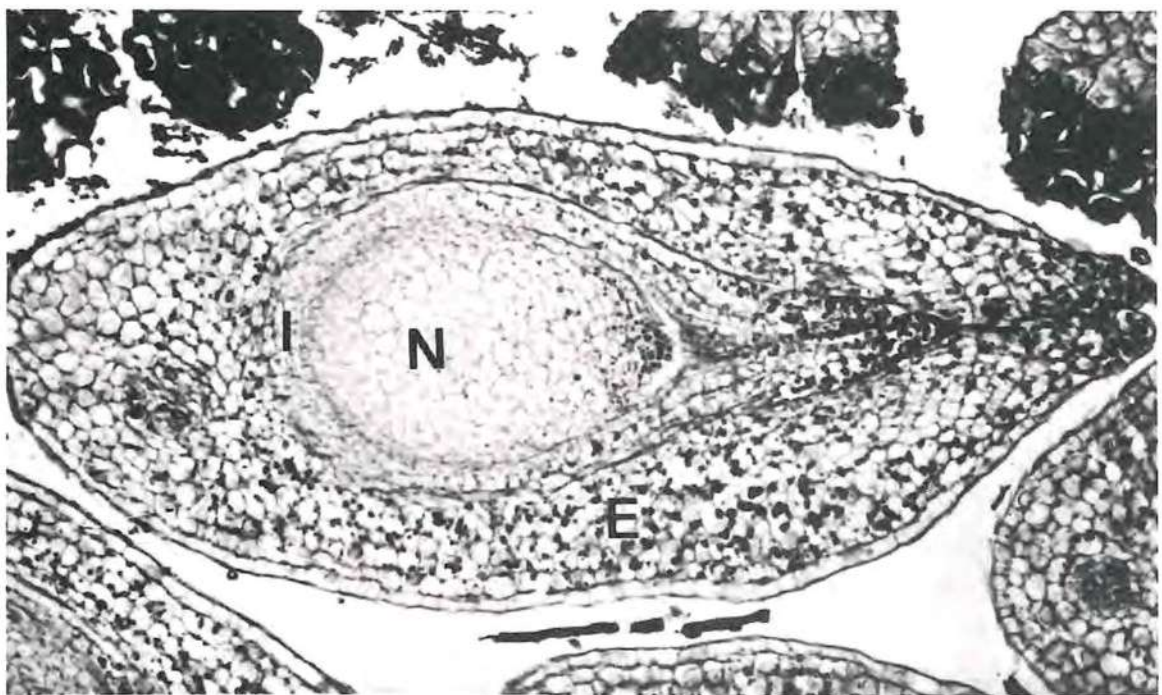


Fig. 2. Sección longitudinal de óvulo de *W. Navel* en época de cultivo. E = tegumento externo; I = tegumento interno; N = nucela ( $\times 157$ ).

e) *Indexing.*

Todos los test se realizaron mediante inoculaciones por injerto de yemas o trozos de corteza en plantas indicadoras. Para la detección de Tristeza y Vein enation se utilizó Lima Mejicana (*C. aurantifolia* [Christm.] Swing.); para Exocortis, cidro Etrog Arizona 861-S-1 (*C. medica* [L.]) (ROISTACHER *et al.*, 1977); para Psoriasis y Concave gum, naranjo dulce Pineapple (*C. sinensis* [L.] Osbeck), y para Xyloporosis, mandarino Parson's Special (*C. reticulata* Blanco), injertado sobre limón Rugoso (*C. jambhiri* Lush) (ROISTACHER, BLUE y CALAVAN, 1973). Para la detección de síntomas de Tristeza, Vein enation, Psoriasis y Concave gum, las plantas indicadoras se cultivaron en invernadero a 18-25°C, tras su inoculación. Para el diagnóstico de Exocortis y Xyloporosis, las plantas indicadoras, una vez inoculadas, se cultivaron a 27-32°C.

f) *Métodos histológicos.*

Las muestras para los estudios histológicos se fijaron en FAA y se incluyeron en parafina según métodos «standard» (JENSEN, 1962). Se obtuvieron secciones seriadas de 10 micras y se tiñeron por el método PAS (BARBER, NAVARRO y TORTOSA, 1972), que es específico para hidratos de carbono.

## RESULTADOS.

Los óvulos tienen forma ovoide, de un tamaño similar en todas las variedades estudiadas. Los óvulos procedentes de ovarios de flores antes de la anthesis tienen una longitud de 0,55-0,62 mm y crecen lentamente con el desarrollo del fruto para alcanzar 1,01-1,04 mm en los frutos de diez semanas de edad. La excepción son los óvulos de *Washington Navel Precoz*, que en los frutos de cuatro semanas alcanzan una longitud de 1,25 mm que no aumenta con el desarrollo posterior del fruto. Dentro de un mismo estadio de desarrollo, los óvulos tienen una gran uniformidad de tamaño.

El diámetro de los ovarios oscila para las variedades estudiadas entre 3,1 y 4,3 mm y el de los frutos de diez semanas de edad entre 18,3 y 24,8 mm. No obstante estos valores pueden estar influenciados por las condiciones climatológicas de cada año. Cada fruto contiene alrededor de cuarenta óvulos. Los estudios histológicos han puesto de manifiesto que en los óvulos utilizados no se ha iniciado la formación de embriones zigóticos o nucelares (fig. 2).

Los óvulos de las distintas variedades tienen un índice de embriogénesis y un comportamiento *in vitro* similar (cuadro 2). La única diferencia obser-

## CUADRO 2

*Influencia de la edad del fruto en la formación de embriones por óvulos de distintas variedades del grupo Navel. Datos expresados en porcentajes*

Edad del fruto desde la antesis (semanas)	Porcentaje de embriogénesis según variedad						
	Navelate CN-1	Navelate CN-2	Navelate P-1	Navelate P-2	W. Navel Precoz	W. Navel	Navelina
0 (*)	45	47	33	53	55	31	21
8	81	95	82	85	97	95	84
4	85	77	85	68	79	98	87
6	86	92	90	91	84	100	87
8	93	92	93	76	—	97	100
10	97	93	94	94	—	93	95

(\*) Ovarios procedentes de flores antes de la antesis.

vada es que los embriones formados por óvulos de *Washington Navel Precoz* tienen una mayor velocidad de crecimiento y además alcanzan un tamaño mayor.

El porcentaje de embriogénesis de los óvulos extraídos de frutos en desarrollo es muy superior al de los óvulos extraídos de los ovarios antes de la antesis (cuadro 2). En cambio, la edad del fruto no tiene influencia significativa en la embriogénesis, aunque se observa una mayor regularidad de altos porcentajes de embriogénesis en los óvulos procedentes de frutos de ocho y diez semanas de edad (cuadro 2).

El primer signo externo de crecimiento de los óvulos se observa a las 4-5 semanas de cultivo *in vitro*, aunque algunos óvulos pueden evolucionar lentamente y tardan hasta 15 semanas antes de iniciar el crecimiento. En general producen un tejido blanco y friable que prolifera rápidamente y forma un callo compuesto por pequeños gránulos (proembriones o «pseudobulbis») (fig. 3) que evolucionan dando lugar a embriones. En ocasiones se producen embriones directamente de la nucela del óvulo (fig. 4) o se forman simultáneamente embriones y callo (fig. 5). Sólo en un caso se ha obtenido un callo con crecimiento continuo sin formación de embriones.

La evolución *in vitro* de los óvulos procedentes de ovarios es similar a los óvulos procedentes de frutos en desarrollo, pero es más lenta, ya que no inician su crecimiento hasta las 8-10 semanas de cultivo.

La formación de nuevos embriones se produce de forma continua, bien por evolución de los proembriones o por «gemación» de los embriones preexistentes, y al cabo de unas 12 semanas de cultivo se obtiene una masa de embriones (fig. 6).

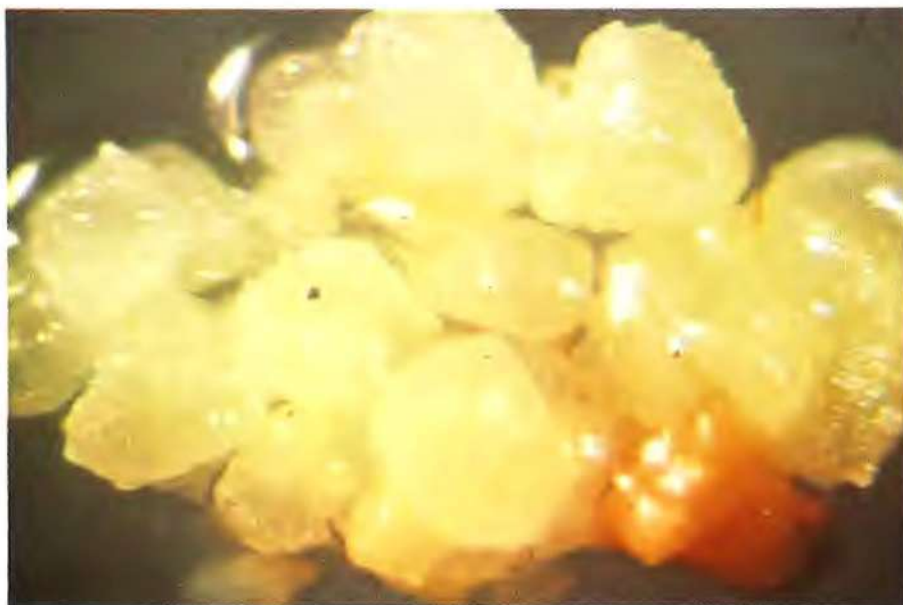


Fig. 3. Callo (amarillo) producido por un óvulo (pardo) de *W. Navel* cultivado *in vitro* después de seis semanas de cultivo ( $\times 40$ ).

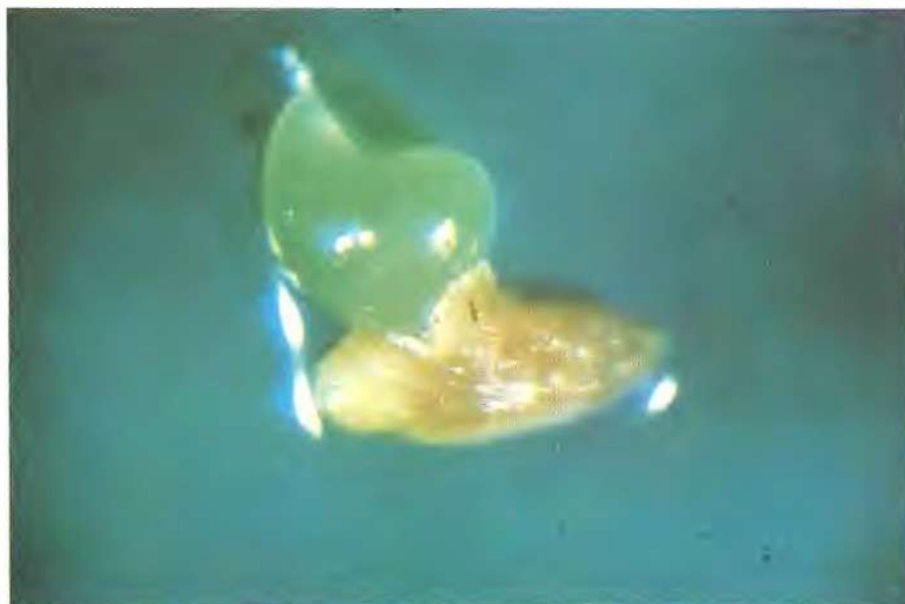


Fig. 4. Embrión (verde) producido directamente por la nucela de un óvulo (pardo) de *W. Navel* después de cinco semanas de cultivo *in vitro* ( $\times 40$ ).





Fig. 5. Embrión (verde) y callo (blanco) producidos simultáneamente por un óvulo (pardo) de *W. Navel* después de seis semanas de cultivo *in vitro* ( $\times 35$ ).



Fig. 6. Masa de embriones producida por un óvulo de *W. Navel* después de 12 semanas de cultivo *in vitro*.



Fig. 7. Embriones utilizados para la germinación ( $\times 2$ ).



Fig. 8. Planta de *W. Navel* después de 64 semanas de cultivo inicial del óvulo.

Gran parte de los embriones tienen características anormales como pluricotilia, anisocotilia y cotiledones fasciados (fig. 7). La germinación de estos embriones da lugar a plantas de características aparentemente normales.

El índice de embriogénesis *in vitro* de óvulos y de nucelas es similar. En las experiencias realizadas un 89 % de los óvulos y un 80 % de las nucelas produjeron embriones. Las nucelas inician el crecimiento con 1-2 semanas de antelación respecto a los óvulos y forman embriones directamente con más frecuencia.

El cuadro 3 muestra la influencia del almacenamiento de frutos a 4°C en el comportamiento posterior de los óvulos cultivados *in vitro*. Los óvulos de los frutos almacenados durante cuatro semanas a 4°C evolucionan más lentamente que los de los frutos sometidos a una conservación más corta. No obstante, el porcentaje de embriogénesis al cabo de 16 semanas de cultivo no es afectado por el almacenamiento.

CUADRO 3

*Influencia del almacenamiento de frutos de Washington Navel (\*) a 4°C en el comportamiento posterior de los óvulos cultivados «in vitro»*

Tiempo de conservación (semanas)	Porcentaje de óvulos con embriones		
	Tiempo de cultivo (semanas)		
	6	10	16
0	30	85	90
1	28	87	87
2	23	79	84
3	32	68	75
4	3	48	84

(\*) Frutos de ocho semanas de edad.

Los embriones del tamaño utilizado para la germinación (4-10 mm) se obtienen al cabo de 10-16 semanas. Para favorecer la germinación, los embriones se recultivan individualmente en el MB, ya que germinan raramente si se dejan en el medio de cultivo inicial mezclados con otros embriones. La formación de raíces se produce entre la primera y segunda semana de cultivo, y la de tallos, entre la tercera y cuarta semana. La adición de ácido giberélico (1 mg/l) y/o sulfato de adenina (27 mg/l) al medio de cultivo no afectan al porcentaje de embriones que emiten raíz (cuadro 4). El sulfato de adenina inhibe ligeramente la formación de brotes (cuadro 4). Las plantas obtenidas en presencia de ácido giberélico se ahilan y tienen que transplantarse al MB para conseguir plantas vigorosas antes de su transplante a macetas.

## CUADRO 4

*Influencia del ácido giberélico (GA) (1 mg/l) y el sulfato de adenina (SA) (27 mg/l) en la germinación de embriones (\*) nucleares de variedades del grupo Navel obtenidos por cultivo de óvulos «in vitro» (\*\*)*

	Medio de cultivo			
	MB	MB+GA	MB+SA	MB+GA+SA
% de embriones con raíz	95	97,5	97,5	92,5
% de embriones con raíz y tallo	82,5	77,5	70	77,5

(\*) Embriones de 4-10 mm de tamaño.

(\*\*) Datos tomados a las 7 semanas de cultivo.

Al cabo de 4 a 8 semanas de cultivo de los embriones se obtienen plantas con una altura del tallo de 2-3 cm, que se transplantan al suelo según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos con más del 90 % de supervivencia.

Veinte plantas obtenidas por cultivo de óvulos *in vitro* de cada uno de los siete clones utilizados (cuadro 1) se han observado durante dos años en invernadero y no se ha detectado ninguna anomalía de crecimiento o de los caracteres morfológicos. Todas las plantas tienen espinas de gran tamaño y ninguna de ellas ha florecido, lo que indica que tienen caracteres juveniles.

Las 140 plantas seleccionadas se han testado a las «virosis» que afectan a los árboles madre de cada variedad (cuadro 1) y todas ellas están libres de Exocortis, Psoriasis, Concave gum y Vein enation. Los tests de Xyloporosis aún no han concluido, ya que tienen una duración de uno a dos años.

Posteriormente se han seleccionado tres plantas nucleares libres de «virus» de cada variedad para su estudio agronómico en condiciones de campo.

## DISCUSIÓN.

En este trabajo se ha realizado el estudio de diversos aspectos de la técnica de cultivo de óvulos *in vitro* con el objetivo fundamental de obtener plantas nucleares libres de «virus» de variedades del grupo Navel.

Con todas las variedades estudiadas se ha obtenido un porcentaje de embriogénesis del 75 al 100 % usando óvulos procedentes de frutos en desarrollo. Este porcentaje es superior a los obtenidos por otros autores en cultivo de óvulos de los naranjos *Shamouti*, *Valencia*, *Robertson Navel* y *Wallace seedless*, del mandarino *Ponkan* y del pomelo *Marsh* (BITTERS *et al.*, 1970; ESAN, 1973; KOCHBA *et al.*, 1972). Es de destacar el elevado



índice de embriogénesis de los óvulos procedentes de ovarios de flores recolectadas antes de la antesis, que en el caso de la variedad *Washington Navel Precoz* llega al 55 %. Utilizando esta misma fuente de óvulos, BITTERS *et al.* (1970) y ESAN (1973) obtuvieron un 10 % de embriogénesis con los naranjos *Robertson Navel* y *Wallace seedless*.

Frutos procedentes de flores expuestas a polinización natural han sido utilizados como fuente de óvulos, suponiendo que estos óvulos no estaban polinizados ni fertilizados, debido a que las variedades utilizadas no producen semillas (BUTTON y BORNMAN, 1971 a, 1971 b; KOCHBA, SPIEGEL-ROY y SAFRAN, 1972). Sin embargo, siguiendo este método hay una pequeña probabilidad de polinización y fertilización de los óvulos y desarrollo posterior del embrión zigótico, que puede dar lugar a plantas distintas de la planta madre. Este peligro es más acusado en las variedades que a pesar de estar calificadas comercialmente como aspermas producen ocasionalmente alguna semilla. El problema puede evitarse usando frutos procedentes de flores emasculadas (MITRA y CHATURVEDI, 1972) o flores recolectadas antes de la antesis como fuente de óvulos.

En nuestro trabajo hemos estudiado 140 plantas obtenidas a partir de frutos expuestos a polinización natural y no hemos detectado ninguna anomalía. Esto puede ser debido a que en las variedades del grupo Navel, como consecuencia de la inviabilidad del polen y de la degeneración del megasporocito, sólo producen alguna semilla en casos extremadamente raros, por lo que el desarrollo de embriones zigóticos es altamente improbable.

La edad del fruto no afecta a la embriogénesis de los óvulos. Este hecho es importante, ya que permite disponer de óvulos para el cultivo *in vitro* durante un período de unos tres meses al año. En algunas experiencias realizadas se han obtenido buenos resultados con frutos de hasta 12 semanas de edad. Para cada variedad, la edad máxima de los frutos de los que pueden extraerse óvulos para cultivo *in vitro* está determinada por el momento de aborción de los óvulos. KOCHBA, SPIEGEL-ROY y SAFRAN (1972) no encontraron influencia de la edad de los frutos de naranjo *Shamouti* en la embriogénesis, mientras que BITTERS *et al.* (1970) obtuvieron un mayor índice de embriogénesis con óvulos de frutos de *Robertson Navel* de seis semanas de edad. En ambos casos, los frutos de más de seis semanas tenían los óvulos abortados. La disparidad de estos resultados puede ser debida a diferencias varietales y/o condiciones ambientales de crecimiento de los frutos. En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias varietales, pero hemos observado diferencias en la velocidad de evolución de los óvulos cultivados *in vitro* de una misma variedad en dos años distintos.

El tipo de evolución *in vitro* de los óvulos de las variedades estudiadas en este trabajo es similar al descrito por otros autores para variedades del grupo Navel (BUTTON y BORNMAN, 1971 a, 1971 b; BUTTON y RIJKENBERG, 1971) y difiere del comportamiento de óvulos de naranjo *Shamouti*, que con frecuencia forman callos en los que posteriormente se diferencian embriones

(BUTTON, KOCHBA y BORNMAN, 1974; KOCHBA, SPIEGEL-ROY y SAFRAN, 1972; KOCHBA y SPIEGEL-ROY, 1973). En nuestro trabajo presentamos la primera evidencia de que algunos embriones se producen directamente por la nucela del óvulo (fig. 4), sin pasar por una fase intermedia de formación de callo.

El porcentaje de embriogénesis de óvulos enteros y de nucelas extraídas de estos óvulos es similar en la variedad *Washington Navel*. KOCHBA, SPIEGEL-ROY y SAFRAN (1972) obtuvieron un mayor porcentaje de embriogénesis con nucelas de naranjo *Valencia* y pomelo *Marsh*, mientras que en naranjo *Shamouti* obtuvieron mejores resultados con óvulos enteros. Esto indica que existen respuestas distintas según la variedad. No obstante, las diferencias son pequeñas y para todas las variedades es aconsejable la utilización de óvulos enteros, ya que el aislamiento de las nucelas es extremadamente difícil y tedioso, debido al pequeño tamaño de los óvulos (0,5-1 mm).

La posibilidad de almacenar frutos sin afectar la capacidad de embriogénesis *in vitro* de los óvulos extraídos de los mismos es importante en dos aspectos. Por una parte permiten ampliar el período de disponibilidad de material para el cultivo. Por otra, facilita enormemente la posible utilización de la técnica de cultivo de óvulos *in vitro* para importar variedades de agrios sin el peligro de introducir «virosis». Para realizar esta importación pueden enviarse desde el país de origen pequeños frutos lavados y fumigados. Los frutos deben introducirse en recipientes cerrados y, si es posible, mantenerlos en refrigeración. Al llegar al país de destino, los óvulos se extraen de los frutos y se cultivan *in vitro* para formar plantas, destruyendo el resto de los tejidos del fruto.

Un 82,5 % de los embriones recultivados individualmente en el MB dan lugar a la formación de plantas. La inclusión en el medio de cultivo de ácido giberélico y sulfato de adenina no aumenta la formación de plantas y en algunos casos se ha observado una ligera inhibición en la formación de tallos. Otros autores han encontrado un efecto beneficioso de estos compuestos en la germinación de embriones (emisión de raíces) (BUTTON y BORNMAN, 1971 a, 1971 b; KOCHBA *et al.*, 1974; KOCHBA y SPIEGEL-ROY, 1973; KOCHBA, SPIEGEL-ROY y SAFRAN, 1972), aunque no mencionan su influencia en la formación de tallos; este efecto es más acusado en los embriones poco desarrollados (KOCHBA *et al.*, 1974), ya que ácido giberélico induce la formación de la radícula y el sulfato de adenina favorece la evolución de la radícula recién formada. En nuestro trabajo hemos utilizado embriones con la radícula y cotiledones bien formados, por lo que estos compuestos no ejercen ningún efecto beneficioso en la formación de plantas. La utilización de estos embriones es aconsejable, aunque se necesite un tiempo ligeramente mayor para su formación, ya que la utilización de embriones más pequeños obliga a la inclusión de ácido giberélico en el medio de cultivo, que produce el efecto adverso del ahilamiento de las plantas, que deben transplantarse a otro medio sin ácido giberélico para su endurecimiento antes del trasplante, lo que hace más engorroso el proceso de obtención de plantas.

En el proceso de trasplante del tubo de ensayo a macetas se han obtenido más del 90 % de supervivencia, lo que contrasta con las elevadas pérdidas obtenidas siguiendo otros métodos (BITTERS *et al.*, 1970; BUTTON y BORNMAN, 1971 a, 1971 b).

El estudio de las plantas obtenidas ha puesto de manifiesto que todas ellas tienen caracteres morfológicos y hábito de crecimiento normal (fig. 8), incluso las procedentes de embriones con características anormales. Embriones y plantas anormales en tubo de ensayo han sido obtenidas por otros autores (BUTTON y BORNMAN, 1971 a, 1971 b; BUTTON, KOCHBA y BORNMAN, 1974), pero no se han publicado datos sobre las características de las plantas establecidas en maceta o campo.

La aparente normalidad de las plantas obtenidas por cultivo de óvulos *in vitro* contrasta con el elevado número de plantas nucelares anormales de variedad monoembriónicas obtenidas mediante cultivo de nucelas *in vitro* (JUÁREZ, NAVARRO y GUARDIOLA, 1976).

Mediante la técnica de cultivo de óvulos *in vitro*, BITTERS *et al.* (1970) consiguieron la eliminación de las enfermedades Exocortis y Psoriasis. En nuestro trabajo, aparte de estas dos «virosis», también se han eliminado Vein enation y Concave gum, y en todos los casos el 100 % de las plantas obtenidas están libres de «virus». Estos resultados son lógicos, ya que, en general, las «virosis» de agrios no se transmiten por semilla.

Se han obtenido plantas nucelares libres de «virus» de *Washington Navel*, de *Navelina* y de *Washington Navel Precoz* y de cuatro orígenes de *Navelate*. Estas plantas tienen caracteres juveniles, de forma análoga a todas las plantas de agrios obtenidas a través del proceso de embriogénesis *in vivo* o *in vitro*. Por consiguiente, no podrán utilizarse a corto plazo para la propagación comercial, pero son una fuente de material sano para el futuro y servirán de alternativa a las plantas libres de «virus» obtenidas por la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (NAVARRO, ROISTACHER y MURASHIGE, 1975), y por consiguiente serán incluidas en el programa de mejora sanitaria de variedades de agrios en España (NAVARRO, 1976, 1977).

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece la ayuda de Juana María ARREGUI y Violeta ORTEGA, que colaboraron en algunas fases de este trabajo.

#### RESUMEN

La obtención de plantas nucelares de variedades poliembriónicas sin semillas presenta importantes problemas. Estos pueden solucionarse mediante la técnica de cultivo *in vitro* de óvulos sin fertilizar antes de su aborto.

En este trabajo se estudian los distintos parámetros de esta técnica y se describe la obtención de plantas nucelares libres de «virus» de las variedades del grupo Navel cultivadas en España.

La evolución de estos óvulos cultivados *in vitro* presenta tres tipos de comportamiento: a) producción de callo con posterior formación de embriones; b) formación simultánea de embriones y callo, y c) formación de embriones directamente.

El cultivo de los embriones da lugar a plantas nucelares, que tienen caracteres juveniles. Todas las plantas obtenidas están libres de Exocortis, Psoriasis, Concave gum y Vein enation. Los test de Xyloporosis aún no han concluido.

Una observación detallada en invernadero muestra que estas plantas tienen gran uniformidad y son morfológicamente normales.

### SUMMARY

Obtaining nucellar plants from seedles polyembryonic varieies is somewhat troublesome. This problem can be avided by culturing *in vitro* unfertilized ovules before abortion takes place.

The different parameters of this technique are studied, and obtaining nucellar plants of the Navel group varieties grown in Spain is also described.

The evolution of the ovules cultured *in vitro* shows three types of behavior: a) Callus-like production with subsequent embryo development; b) simultaneous embryo and callus-like formation, and c) direct embryo formation.

Plants obtained by this method have juvenile characters, and they have found free of Exocortis, Psorosis, Concave gum and Vein ention. Xyloporosis test are still underway.

Detailed observation of these plants in the greenhouse have shown that they are highly uniform and morfologically normal.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BARBER S., NAVARRO L., TORTOSA E., 1972. Estudio histológico del germen de arroz. *A. T. A.*, **12**, 232-235.
- BITTERS W. P., MURASHIGE T., RANGAN T. S., NAUER E., 1970. Investigations on established virus-free plants through tissue culture. *Calif. Citrus Nurseymen's Soc.*, **9**, 27-30.
- BUTTON J., BORNMAN C. H. 1971 a. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of Washington navel orange *in vitro*. *Jl. S. Afr. Bot.*, **37**, 127-134.
- BUTTON J., BORNMAN C. H., 1971 b. Development of nucellar plants from unfertilized ovules of the Washington navel orange through tissue culture. *Citrus Grow. and Subtrop. Fruit. J.* September, 11-14.
- BUTTON J., RIJKENBERG F. H. J., 1977. The effect of subculture interval on organogenesis in callus culturs of *Citrus sinensis*. *Acta Horticulturae*, **78**, 225-236.
- BUTTON J., KOCHBA J., BORNMAN C. H., 1974. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of «Shamouti» orange (*C. sinensis* Osb.). *J. exp. Bot.*, **25**, 446-457.
- ESAN E. B., 1973. *A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae*, Ph. D. thesis, University of California, Riverside.
- GONZÁLEZ-SICILIA E., BONO R., GUARDIOLA J. L., SÁNCHEZ-CAPUCHINO J. A., 1977. *Selección de material exento de virus*. I Congreso Mundial de Citricultura II, 595-600. Intern. Soc. Citriculture, Murcia, Spain.
- JENSEN W. A., 1962. *Botanical histochemistry*, 408 p. Ed. Freeman and Co., San Francisco y Londres.
- JUÁREZ J., NAVARRO L., GUARDIOLA J. L., 1976. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clementinier au moyen de la culture de nucelle *in vitro*. *Fruits*, **31**, 751-762.



- KOCHBA J., BUTTON J., SPIEGEL-ROY P., BORNMAN C. H., KOCHBA M., 1974. Stimulation of rooting of Citrus embryoids by giberellic acid and adenine sulphate. *Ann. Bot.*, **38**, 795-802.
- KOCHBA J., SPIEGEL-ROY P., 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of «Shamouti» orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflzücht.*, **69**, 156-162.
- KOCHBA J., SPIEGEL-ROY P., SAFRAN H., 1972. Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. *Planta*, **106**, 237-245.
- MITRA G. C., CHATURVEDI H. C., 1972. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo* grown emasculated flower buds of *Citrus* ssp. *Bull. Torrey Bot. Club*, **99**, 184-189.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Pl.*, **15**, 473-497.
- NAUER E. M., ROISTACHER C. N., LABANAUSKAS C. K., 1968. Growing citrus in modified UC potting mixtures. *CA Citrog.*, **53**, 456, 460-461.
- NAVARRO L., 1976. The Citrus Variety Improvement Program in Spain. En: *Proc. 7th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol.*, pp. 198-203. Ed. E. C. Calavan, IOCV, Riverside.
- NAVARRO L., 1977. *Citrus virus diseases in Spain in relation to plant production: present and future prospects*, *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1**, 136-40.
- NAVARRO L., JUÁREZ J., 1977. *Elimination of Citrus pathogens in propagative budwood. II. In vitro propagation.*, *Proc. Int. Soc. Citriculture*, **3**, 973-987.
- NAVARRO L., ROISTACHER C. N., MURASHIGE T., 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **100**, (5), 471-479.
- NAVARRO L., ROISTACHER C. N., MURASHIGE T., 1976. Effect of size and source of shoot tips on psorosis-A and exocortis content of navel orange plants obtained by shoot-tip grafting *in vitro*. En: *Proc. 7th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol.*, pp. 194-197. Ed. E. C. Calavan, IOCV, Riverside.
- ROISTACHER C. N. En prensa. *Elimination of Citrus pathogens in propagative budwood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy*, *Proc. Int. Soc. Citriculture*.
- ROISTACHER C. N., BLUE R. L., CALAVAN E. C., 1973. A new test for Citrus cachexia. *CA Citrog.*, **58**, 261-262.
- ROISTACHER C. N., CALAVAN E. C., BLUE R. L., NAVARRO L., GONZALES R., 1977. A new more sensitive citron indicator for detection of mild isolates of Citrus exocortis viroid (CEV). *Pl. Dis. Repr.*, **61**, 135-139.
- ROISTACHER C. N., NAVARRO L., MURASHIGE T., 1976. Recovery of Citrus selections free of several viruses, exocortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot tip grafting *in vitro*. En: *Proc. 7th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol.*, pp. 186-193. Ed. E. C. Calavan, IOCV, Riverside.